FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1925 — **THÈSE** — N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Antonine AMER, née BOY

Née le 21 août 1898 à Lons-le-Saunier (Jura)

SUR LA

RECHERCHE DE L'UROBILINE

DANS LE SANG

Président : M. SICARD, *Professeur*

PARIS

LIBRAIRIE LOUIS ARNETTE

2, RUE CASIMIR DELAVIGNE, 2

1925

LE DOYEN. . . M. ROGER.

I. — PROFESSEURS

	MM.
Anatomie	NICOLAS.
Anatomie médico chirurgicale	CUNÉO.
Physiologie	Ch. RICHET.
Physique médicale	André BROCA.
Chimie organique et chimie générale	DESGREZ.
Bactériologie	BEZANÇON.
Parasitologie et histoire naturelle médicale	BRUMPT.
Pathologie et thérapeutique générales	Marcel LABBÉ
Pathologie médicale	SICARD.
Pathologie chirurgicale	LECENE.
Anatomie pathologique	LETULLE.
Histologie	PRENANT.
Pharmacologie et matière médicale	RICHAUD.
Thérapeutique	CARNOT.
Hygiène	Léon BERNARD.
Médecine légale	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	MENETRIER.
Pathologie expérimentale et comparée	ROGER.
Clinique médicale	GILBERT. CHAUFFARD. ACHARD. WIDAL.
Hygiène et clinique de la première enfance	MARFAN.
Clinique des maladies des enfants	NOBECOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale	H. CLAUDE.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	JEANSELME.
Clinique des maladies du système nerveux	GUILLAIN.
Clinique des maladies infectieuses	TESSIER.
Clinique chirurgicale	DELBET. HARTMANN. LEJARS. GOSSET.
Clinique ophtalmologique	De LAPERSONNE.
Clinique urologique	LEGUEU.
Clinique d'accouchements	COUVELAIRE. BRINDEAU. JEANNIN.
Clinique gynécologique	J.-L. FAURE.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	BROCA Auguste.
Clinique thérapeutique médicale	VAQUEZ.
Clinique oto-rhino-laryngologique	SEBILEAU.
Clinique thérapeutique chirurgicale	DUVAL.
Clinique propédeutique	SERGENT.

II. — AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM.	
ABRAMI . . .	Pathologie médica'e.
ALGLAVE . .	Pathologie chirurgicale
AUBERTIN . .	Pathologie médicale.
BASSET . . .	Pathologie chirurgicale.
BAUDOUIN . .	Pathologie médicale.
BINET	Physiologie.
BLANCHETIÈRE . . .	Chimie biologique.
BRANCA . . .	Histologie.
BRULÉ	Pathologie médicale.
BUSQUET . .	Pharmacologie et matière médicale.
CADENAT . .	Pathologie chirurgicale.
CHAMPY . .	Histologie.
CHIRAY . .	Pathologie médicale.
CLERC . . .	
DEBRÉ	Hygiène.
I. de JONG . .	Anatomie pathologique.
DUVOIR . . .	Médecine légale.
ECALLE . . .	Obstétrique.
FIESSINGER	Pathologie médicale.
FOIX	
GARNIER. . .	Pathologie expérimentle.
HARVIER. . .	Pathologie médicale.
HEITZ-BOYER	Urologie.
HOVELACQUE	Anatomie.
JOYEUX . . .	Parasitologie.

MM	
LABBÉ(Henri).	Chimie biologique.
LARDENNOIS.	Pathologie chirurgicale.
LE LORIER. .	Obstétrique.
LEMAITRE. .	Oto-rhino-laryngologie
LEMIERRE . .	Pathologie médicale.
LEVY-SOLAL.	Obstétrique.
LHERMITTE .	Pathologie mentale.
LIAN.	Pathologie médicale.
MATHIEU . .	Pathologie chirurgicale.
METZGER. . .	Obstétrique.
MOCQUOT .	Pathologie chirurgicale.
MONDOR .	
MOURE. . .	
MULON. . . .	Histologie.
PHILIBERT. .	Bactériologie.
RIBIERRE . .	Pathologie médicale.
RICHET Fils .	Physiologie.
ROUVIERE . .	Anatomie.
STROHL . . .	Physique médicale.
TANON	Pathologie médicale.
TIFFENEAU .	Pharmacologie et matière médicale.
VAUDESCAL .	Obstétrique.
VERNE	Histologie.
VILLARET . .	Pathologie médicale.
WELTER. . .	Ophtalmologie.

III. — AGRÉGÉS RAPPELÉS A L'EXERCICE

pour le service des examens

MM.	
CAMUS	Physiologie.
GOUGEROT. .	Pathologie médicale.
GUÉNIOT. . .	Obstétrique.

MM.	
RETTERER. .	Histologie.
ROUSSY . . .	Anatomie pathologique.

IV — AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE

à titre permanent

MM.	
AUVRAY . .	Clinique chirurgicale.
CHEVASSU .	
LAIGNEL-LAVASTINE. .	Clinique médicale.
LEREBOULLET . . .	Clinique médicale infantile.
LÉRI	Clinique médicale.
LŒPER. . .	

MM.	
OMBRÉDANNE	Clinique chirurgicale infantile.
PROUST . . .	Clinique chirurgicale.
RATHERY . .	Clinique médicale.
SCHWARTZ. .	Clinique chirurgicale.
TERRIEN . . .	Cliniq. ophtalmologique.

V. — CHARGÉS DE COURS

MM. MAUCLAIRE, agrégé	Chargé du cours de chirurgie orthopédique chez l'adulte pour les accidentés du travail, les mutilés de guerre et les infirmes adultes.
FREY	Stomatologie.
N...	Education physique.
LEDOUX-LEBARD	Radiologie clinique.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A LA MÉMOIRE DE MON GRAND'PERE

A MON PERE

A MA MÈRE

A Monsieur le Professeur SICARD

Qui a bien voulu nous faire l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

A Monsieur le Docteur BRULÉ

Professeur Agrégé
Médecin des Hôpitaux

Qui nous a inspiré le sujet de cette thèse.

Nous tenons à lui exprimer ici notre très vive reconnaissance pour la bienveillance qu'il n'a cessé de nous témoigner.

A TOUS MES MAITRES DANS LES HOPITAUX

Nous tenons à remercier M. le Professeur Widal, qui a bien voulu, pour faciliter ce travail, mettre à notre disposition le laboratoire de Chimie de son service, à l'Hôpital Cochin.

IMPORTANCE DE LA RECHERCHE DE L'UROBILINE DANS LE SANG

Depuis la découverte de l'urobiline par Jaffé, à la fin du siècle dernier, tous les auteurs qui ont étudié ce pigment, se sont préoccupés de sa recherche dans le sang.

L'absence ou la présence de l'urobiline dans le sérum sanguin, est en effet intimement liée au problème de son origine dans l'organisme, problème qui a donné lieu à de nombreuses discussions et fait éclore de nombreuses théories.

Mais les différentes hypothèses émises sur cette pathogénie peuvent se ramener à deux groupes principaux : d'un côté, celles qui affirment la fréquence d'urobilinurie sans urobilinémie, et, plaçant dans le rein le processus formateur de l'urobiline, aboutissent à la théorie rénale. De l'autre, celles qui le placent en dehors du rein, et admettent que l'apparition d'urobiline dans l'urine implique la coexistence de ce pigment dans le sang : théories hépatique, entéro-hépatique, hématique, tissulaire.

La recherche de l'urobiline dans le sang a donc été un point capital dans l'étude de ce pigment, et on voit

de suite l'importance que devaient prendre, dans l'esprit des auteurs, les différentes méthodes de caractérisation.

Que leur procédé ne leur permette pas de mettre en évidence dans le sang, le pigment qu'ils recherchent, ils concluent à son absence, de là est née la théorie rénale. Deux liquides et deux faits sont en présence : d'une part, le sang, qui ne contient pas d'urobiline, mais seulement la substance dont elle dérive, d'autre part, l'urine, ce produit d'excrétion du sang, qui en contient.

Où se formerait donc l'urobiline si ce n'est au niveau de l'organe intermédiaire à l'urine et au sang, et dont le rôle est de fabriquer l'un aux dépens de l'autre ? La déduction est logique, mais le point de départ en est faux. L'erreur de ces auteurs est d'avoir admis que l'urobiline n'existait pas dans le sang, parce qu'ils ne l'y avaient pas trouvée.

C'est en Allemagne, en 1888, que cette théorie a pris naissance avec Leube, de Wurtzbourg.

Soutenue en Italie par Mya, Accorimboni, Patella, Giarre ; en Angleterre, par Harley, elle fut mentionnée en France pour la première fois, par Boix, et bientôt admise par M. le Pr Gilbert, qui l'appuya de tout le poids de son autorité.

Tous ces auteurs s'appuyaient sur la constatation, qu'ils croyaient réelle, d'urobilinurie sans urobilinémie préalable. Le promoteur de la théorie, Leube, avait été conduit à ce résultat à la suite d'une injection de pilocarpine chez un ictérique. L'urine du malade contenait

une grande quantité d'urobiline. Or, l'analyse de la sueur que provoqua l'injection, se montra riche en bilirubine, et totalement dépourvue d'urobiline. Leube en conclut, les éléments de la sueur ayant été empruntés au sang, que ce dernier ne renfermait pas d'urobiline.

L'expérience, reprise plus tard par Tissier, permit au contraire à ce dernier, de caractériser ce pigment dans la sueur, où il avait passé grâce à sa grande diffusibilité.

M. Gilbert et ses élèves Herscher et Lereboullet soutinrent l'hypothèse de Leube après de multiples recherches, relatées dans de nombreuses publications. Ils invoquent à l'appui de la théorie, les constatations suivantes :

1° « L'urobilinurie, sans urobilinémie, est remarqua- » blement fréquente ».

2° « Dans les cas d'urobilinurie, sans urobilinémie, le » sérum contient des pigments biliaires ».

3° Le liquide d'ascite « équivalant au sérum » ne contient pas d'urobiline, alors que l'urine en renferme.

L'urobiline se formerait donc au niveau du rein.

Pour démontrer le bien-fondé de ce qu'ils avancent, ils cherchent à prouver que le parenchyme rénal a un pouvoir réducteur. Car il est acquis depuis longtemps, que l'urobiline naît de la bilirubine par des phénomènes de réduction auxquels peuvent s'associer des phénomènes d'hydratation.

Dans ce but, ils rapportent qu'après avoir lavé, puis broyé des reins de lapin et de chien, ils ont fait agir

cette pulpe rénale sur une solution de bilirubine. Le mélange, mis avec soin à l'abri de l'air, de la lumière et de la putréfaction, avait donné après 48 heures, les réactions de l'urobiline. L'expérience d'Ehrlich faisant à un chien une injection intraveineuse de bleu d'alizarine, qu'il retrouve réduit dans la substance corticale du rein, est, pour eux, également concluante.

Mais, voulant fortifier leur théorie, et se mettre à l'abri d'une objection sérieuse, MM. Gilbert et Herscher ont donné une explication des cas d'ictères intenses où la bilirubine passe en nature dans l'urine : A ce moment, le rein recevant du sang une énorme quantité de pigments biliaires, serait « stupéfié ». De même qu'un estomac recevant une surabondance d'aliments, ne pouvant effectuer normalement la digestion, rejette les aliments, ou ne les transforme pas, de même le rein serait au-dessous de sa tâche, et éliminerait la bilirubine sans lui faire subir de modifications.

De ce bref exposé de la théorie rénale, nous voulons retenir que MM. Gilbert et Herscher s'en sont faits les défenseurs, après avoir acquis la conviction que l'urobilinurie n'implique pas l'existence préalable d'urobilinémie.

C'est à la suite d'un grand nombre d'analyses, tant en ce qui concerne le sérum qu'en ce qui concerne l'urine, qu'ils ont été amenés à cette constatation. Néanmoins, il faut remarquer que si, dans la plupart des cas d'urobilinurie, ils n'ont pas trouvé d'urobiline dans le sang, dans un petit nombre d'autres, au contraire, ils l'y ont nettement décelée. Ils écrivent : « Si quelque-

» fois, l'urobiline existait dans le sérum, presque tou-
» jours elle manquait dans ce liquide ».

Ailleurs : « Parfois, à la présence de pigments bi-
» liaires dans le sérum, peut se joindre une petite quan-
» tité d'urobiline, appréciable au spectroscope ».

Et enfin, on lit comme conclusion d'un article : « La
» théorie de l'origine rénale de l'urobiline rend ainsi
» compte de la majeure partie des cas d'urobilinurie.
» Toutefois, l'urobiline peut exister dans le sérum, et
» alors on est obligé d'invoquer les autres théories
» émises, la théorie hépatique en particulier. Mais ces
» cas nous paraissent infiniment plus rares que ceux
» d'urobilinurie sans urobilinémie ».

Ces constatations, résumées dans la thèse de Monsieur Herscher, sont appuyées de 57 observations, « où
» l'urobilinurie était extrêmement intense, et où le sé-
» rum contenait des pigments biliaires, mais ne renfer-
» mait pas la moindre trace d'urobiline ».

Pendant plus d'une année, M. Herscher a examiné le sérum de tous les malades soignés dans le service de M. le Professeur Gilbert, à l'hôpital Broussais, et ce sont les seuls cas qu'il ait pu relever à l'appui de la théorie.

Ainsi, les résultats obtenus n'ont pas été constants ; les analyses de l'urobiline sanguine ont été tantôt positives, tantôt négatives. Outre que ce fait enlève de la consistance à la théorie rénale, il laisse à penser que les moyens d'investigations dont se sont servis ces auteurs pour leurs recherches, manquaient de sensibilité.

Et, précisément, la théorie rénale ne peut résister à l'emploi d'une bonne méthode de caractérisation d'urobiline dans le sang. Nous nous proposons dans les pages qui vont suivre, de passer en revue les méthodes employées jusqu'à ce jour, et de signaler leurs points faibles.

Nous exposerons enfin le procédé préconisé par Monsieur Brulé. Ce procédé, au cours des examens que nous avons faits, a donné toute satisfaction.

PROCÉDÉS DE RECHERCHE DE L'UROBILINE DANS LE SANG

La recherche de l'urobiline dans le sang offre plus de difficultés que dans l'urine. C'est un examen délicat, qui nécessite l'emploi d'une méthode suffisamment sensible.

Pour cette recherche, on a employé deux procédés : un procédé physique et un procédé chimique, basés tous deux sur des propriétés importantes de l'urobiline.

Le procédé physique est un procédé spectroscopique. Il utilise la propriété que possède l'urobiline, de donner une bande d'absorption située entre le vert et le bleu, entre les raies b et F du spectre.

Le procédé chimique, pour déceler l'urobiline dans le sang, est le plus ancien, puisqu'il a déjà été décrit par Jaffé, en 1887. Il est basé sur la propriété que possèdent les solutions d'urobiline, de produire une fluorescence verte spéciale, par addition de sels de zinc.

Procédé spectroscopique

Il consiste à examiner le sérum au spectroscope, pour y déceler la raie caractéristique du spectre de l'urobiline.

Ce procédé n'a pas donné de résultats constants.

Certains auteurs s'en sont servis avec succès. C'est ainsi qu'il a permis à M. le Professeur Hayem de mettre en évidence l'urobiline dans le sang, et d'écrire : « L'urobiline se voit plus fréquemment encore dans le » sérum que dans l'urine. Elle y acquiert une telle ten» sion, que la raie est facilement visible sous une cer» taine épaisseur. alors que sous cette même épaisseur, » on ne la voit pas dans l'urine correspondante ».

D'autres, comme MM. Gilbert et Herscher, n'ont obtenu le plus souvent par ce moyen, que des résultats négatifs, même dans des cas d'urobilinurie intense.

Ces résultats différents s'expliquent, si l'on considère que la sensibilité de la méthode spectrale varie suivant les conditions d'examen.

Comme certains l'ont fait remarquer elle dépend :

1° de l'appareil qui sert à la recherche.

Qu'on utilise le grand spectroscope, ou le petit spectroscope à vision directe, vulgarisé par Hayem, la sensibilité dépend du pouvoir dispersif du spectroscope, et du pouvoir éclairant de la source lumineuse ;

2° de la solution à examiner.

Tout d'abord, il n'est pas indifférent que l'urobiline soit en plus ou moins grande proportion dans le sérum. Une quantité trop minime du pigment ne se manifeste pas sur le spectre.

De plus, elle doit y être dans un état de dilution suffisante : La raie caractéristique, en effet, n'apparaît pas plus avec une concentration trop faible qu'avec une concentration trop forte. M. Herscher lui-même, signale

ces inconvénients dans sa thèse, à propos d'une expérimentation sur le liquide d'ascite : « Prenant une cer-
» taine quantité d'ascite, nous lui ajoutions un peu
» d'urine urobilinique, et nous arrivions par tâtonne-
» ments, à constater qu'à un certain degré de dilution,
» nous ne pouvions plus caractériser par le spectros-
» cope, l'urobiline du mélange. Si nous regardions sous
» une faible épaisseur, nous ne voyions rien ; si nous
» augmentions l'épaisseur, le spectre s'éteignait. Nous
» additionnions alors le liquide d'une faible couche
» d'eau. Mais la quantité d'urobiline contenue dans le
» mélange, était si faible, que même après des examens
» répétés et une longue attente, nous n'arrivions pas à
» la reconnaître d'une manière certaine par l'examen
» spectroscopique ».

L'expérience a prouvé également à ceux qui ont employé ce procédé, que les fortes colorations du sérum par abondance de pigments biliaires, assombrissent certaines régions du spectre, et gênent la visibilité.

C'est ainsi qu'avec un sérum de coloration moyenne il y aurait obscurcissement de toute la partie droite du spectre, la bande d'absorption demeurant toutefois nettement visible. Une coloration intense effacerait complétement cette raie.

C'est pour éliminer cette action des pigments, et pour isoler l'urobiline, que M. Gilbert a eu recours au procédé de Hayem : A la surface du sérum placé dans des éprouvettes, on versait quelques gouttes d'eau iodée. L'urobiline, plus diffusible que les pigments biliaires, passait seule, rapidement, dans cette eau sur

laquelle on faisait alors uniquement porter l'examen. Or, par ce procédé, « même par des examens prolongés, » et répétés à maintes reprises, nous n'avons pu — dit » M. Gilbert, — déceler la moindre trace d'urobiline ».

Il n'est pas douteux que cet artifice, au moyen duquel on dilue encore le sérum, n'ait été souvent défavorable à la recherche de l'urobiline, surtout dans les cas où le sérum n'en contenait qu'une faible proportion.

Il nous paraît résulter de tous ces inconvénients et causes d'erreur, que la méthode spectroscopique employée pour caractériser l'urobiline dans le sang, est un procédé peu sensible, et qu'elle constitue plus un moyen de contrôle, qu'un moyen de recherche.

Procédés chimiques

Tous les procédés chimiques caractérisent l'urobiline par la fluorescence de ses solutions en présence des sels de zinc.

Mais, dans le but de faciliter cette caractérisation, la plupart des procédés tendent à extraire l'urobiline du sérum, afin de l'isoler des autres substances, albumines ou pigments, dont la présence est susceptible de gêner l'apparition de cette fluorescence.

Pour réaliser cette extraction, certains traitent le sérum par un dissolvant de l'urobiline, dans lequel le pigment passe, à l'exclusion des substances qu'on désire éliminer.

D'autres entraînent d'abord les substances à éliminer,

dans un coagulum, puis rassemblent l'urobiline dans une petite quantité d'un solvant approprié.

Un dernier procédé, enfin, caractérise l'urobiline en présence des pigments biliaires, sans tentative d'extraction.

Ces différences nous serviront à classer les méthodes :

I. — Extraction de l'urobiline par le seul emploi de dissolvants.

Les procédés de ce groupe utilisent la propriété de l'urobiline d'être soluble dans l'alcool amylique, le chloroforme, l'éther acétique, l'alcool éthylique.

Riva emploie l'alcool amylique comme dissolvant de l'urobiline.

On agite fortement dans un verre, un mélange à parties égales, de sérum et d'alcool amylique. Après la séparation des liquides, par le repos, on décante l'alcool amylique ; on l'évapore jusqu'à réduction à 3 ou 4 cc., et on l'additionne de quelques gouttes de chlorure de zinc ammoniacal.

La fluorescence verte apparaît dans le liquide s'il contient de l'urobiline.

De leur côté, Roman et Delluc utilisent le chloroforme pour dissoudre l'urobiline, et l'acétate de zinc pour provoquer la fluorescence.

Ils traitent le sérum par le chloroforme, le décantent dans une ampoule à robinet, concentrent la solution chloroformique obtenue, et l'additionnent de quelques gouttes d'une solution d'acétate de zinc dans l'alcool à 95°.

Nous signalerons aussi le procédé de Kiener et Engel, qui dissout l'urobiline dans le chloroforme, après l'avoir rassemblée avec l'albumine et les pigments dans un précipité. On sature imparfaitement le sérum par le chlorure de zinc. On filtre, et on sature à nouveau le filtrat par une deuxième addition de chlorure de zinc.

On filtre encore, et on recommence plusieurs fois, jusqu'à ce qu'il ne se produise plus de précipité dans le liquide filtré.

Les différents précipités qui contiennent l'urobiline, ainsi que l'albumine et les pigments, sont traités par le chloroforme ou l'alcool éthylique.

Dans la solution concentrée, on cherche alors à caractériser l'urobiline.

Dans la technique indiquée par M. Lemaire, l'éther acétique est choisi comme dissolvant.

La solution d'éther acétique contenant l'urobiline se sépare facilement du sérum. Après évaporation, on l'additionne du réactif suivant :

Chlorure de zinc	1	gramme
Alcool à 90°	30	—
Ammoniaque	10	—
Ether acétique	60	—

jusqu'à ce qu'on obtienne un liquide parfaitement clair. La fluorescence indique une réaction positive.

*
* *

Les trois premières méthodes, que nous venons de décrire, ont été — les deux premières surtout, — em-

ployées par MM. Gilbert et Herscher au cours de leurs recherches. Par elles, de même qu'avec le spectroscope, rarement ils ont pu déceler l'urobiline dans le sang. Car, pas plus que la spectroscopie, ces procédés n'offrent de garantie de sensibilité.

Ainsi que l'ont fait remarquer Morel et Policard, l'extraction de l'urobiline par un dissolvant aussi peu miscible à l'eau que le sont l'acide amylique ou le chloroforme, risque de ne pas être complète. Il n'est pas surprenant, dans ces conditions, qu'une faible urobilinémie puisse passer inaperçue.

Le peu de sensibilité de ces méthodes paraît ne pas avoir échappé à MM. Gilbert et Herscher, eux-mêmes. Ils reconnaissent qu'elles sont moins sensibles avec le sang qu'avec l'urine, et ils attribuent cette différence à la présence de l'albumine sanguine.

« Quand on traite, écrivent-ils, par l'alcool amylique, » un liquide albumineux contenant de l'urobiline, une » petite quantité de ce pigment reste dans le liquide al- » bumineux, mais la majeure partie est dissoute dans » l'alcool amylique. Il faut donc disposer d'une quan- » tité considérable de liquide à examiner ».

D'ailleurs, l'emploi de ces solvants n'était pas sans leur créer une légère difficulté : L'agitation du sérum — avec l'alcool amylique principalement — produit une émulsion gênante et stable, et ils devaient centrifuger, pour en détruire sinon la totalité, du moins la plus grande partie.

C'est pour remédier à cet inconvénient, que Monsieur Lemaire préférait employer l'éther acétique, « excellent

dissolvant de l'urobiline et qui se sépare très facilement ».

II. — **Extraction de l'urobiline par un dissolvant, après élimination des pigments.**

C'est à M. Grigaut que nous devons cette méthode. Il l'a proposée dès 1909, et l'a expérimentée dans le service de M. le Prof. Chauffard.

Elle comprend plusieurs temps :

1° L'oxydation du chromogène de l'urobiline au moyen d'un réactif oxydant ;

2° La coagulation des albumines du sérum par la chaleur, le coagulum entraînant avec lui les pigments biliaires vrais ;

3° L'extraction de l'urobiline demeurée dans le sérum ainsi modifié ;

4° La caractérisation du pigment dans sa solution chloroformique.

Nous ne pouvons mieux faire, pour exposer les détails de la technique, que de reproduire la description qu'en a faite M. Grigaut lui-même :

« 10 à 20 cc. de sérum frais, étendus de leur volume » d'eau distillée, sont additionnés de 10 cc. du réactif » suivant :

« Perchlorure de fer officinal..... 5 gouttes
« Acide acétique au 1/10e..... 20 cc.
« Eau distillée..... 80 —

« Le mélange, préalablement saturé de sulfate de

» soude, est placé dans une capsule de porcelaine, puis » porté à l'ébullition, en agitant de temps à autre. On » filtre dans une ampoule à robinet. Les pigments bi- » liaires entraînés par l'albumine coagulée restent avec » elle sur le filtre. L'urobiline passe dans le liquide. » Au filtrat refroidi, on ajoute 4 cc. de chloroforme » thymolé à 15 0/0, selon la formule préconisée par » M. Auché.

« Après légère agitation, le chloroforme, qui se sé- » pare avec une grande facilité, est passé sur un petit » tampon de coton hydrophile et reçu dans un tube à » essai.

« La solution d'acétate de zinc :

« Acétate de zinc..... 3
« Acide acétique..... 1
« Alcool à 93°..... 500

« est alors versée jusqu'à cessation du précipité ».

Nous apprécierons plus loin ce procédé, et indiquerons les résultats qu'il nous a donnés.

Exposons tout d'abord celui qui a notre préférence, et dont nous nous sommes servie pour nos examens.

Ce procédé a été préconisé par M. Brulé depuis quelques années déjà. C'est celui qui fut proposé autrefois par Schlesinger, pour caractériser l'urobiline dans l'urine.

Nous opérons ainsi :

On mélange dans un tube à essai, quelques centimètres cubes de sérum (nous avons employé des quantités variant entre 2 à 5 cc.) avec une quantité double

d'alcool absolu, et une pincée d'acétate de zinc en poudre.

On filtre à plusieurs reprises sur le même filtre, jusqu'à l'obtention d'une limpidité parfaite.

Dans la plupart des cas, la fluorescence apparaît à la lumière solaire. Dans les autres, nous la recherchons en faisant traverser par un faisceau de lumière artificielle, le tube placé dans un espace obscur.

Nous avons, par ce procédé, caractérisé l'urobiline dans un certain nombre de sérums. La même recherche ayant été faite également, à plusieurs reprises, au moyen de la technique de Grigaut, nous avons pu comparer ces deux réactions.

L'exécution des deux techniques fait ressortir la simplicité et la rapidité de la première.

La réaction de Grigaut, en effet, est manifestement plus complexe. Elle nécessite plus de manipulations, et, partant, est plus longue à exécuter que celle de Schlesinger.

D'autre part, elle exige l'emploi d'une plus grande quantité de sérum.

Il nous est arrivé plusieurs fois, avec la méthode de Schlesinger, de caractériser nettement l'urobiline contenue dans 2 cc. de sérum, quantité insuffisante pour exécuter la réaction de Grigaut.

De plus, pratiquant les deux réactions sur la même quantité d'un même sérum — 6 cc. dans un de nos cas, — nous avons toujours obtenu une fluorescence plus intense dans le sérum traité par la méthode de Schlesinger.

Dans la majorité des cas, cette fluorescence était appréciable à la lumière du jour. Au contraire, par la méthode de Grigaut, il fallait examiner le liquide à la lumière artificielle pour y déceler la fluorescence.

Enfin, pour trois de nos examens, où la réaction de Schlesinger est restée négative — nous en dirons le motif plus loin, — la réaction de Grigaut ne nous a pas donné un meilleur résultat.

En raison de ces constatations, nous estimons que la réaction de Schlesinger est supérieure à la réaction de Grigaut, par sa simplicité et sa sensibilité. La complexité de cette dernière ne peut que nuire à sa sensibilité, l'urobiline étant un pigment fragile, qu'on risque de détruire si on lui fait subir trop de manipulations.

On ne se trouve pas exposé à cet inconvénient si on adopte la technique, plus simple, de Schlesinger, qui consiste, en effet, à rechercher l'urobiline directement dans le sérum, sans extraction préalable de ce pigment.

De plus, il n'est pas jusqu'à l'oxydation brutale du chromogène par le perchlorure de fer et l'acide acétique, qui ne soit capable, dans la réaction de Grigaut, de détruire une partie de l'urobiline.

On n'ignore pas, en effet, et certains auteurs ont insisté sur ce point, que l'urobiline se transforme avec la plus grande facilité en d'autres pigments ne donnant plus lieu à la fluorescence. Or les oxydants sont des agents actifs de cette transformation. On comprend alors qu'une oxydation aussi violente que celle réalisée par le procédé de Grigaut, soit susceptible de transfor-

mer, en même temps que le chromogène, une certaine partie de l'urobiline, qui est alors perdue pour la réaction.

Avec la technique de Schlesinger, au contraire, on ne compte pour effectuer l'oxydation, que sur le contact du sérum avec l'air et un léger excès d'acétate de zinc.

Quelques auteurs étrangers ont employé une méthode sensiblement analogue à la nôtre ; mais, pour activer l'oxydation, ils ajoutaient au sérum quelques gouttes de teinture d'iode.

Les uns, comme Obermayer et Popper, puis Eppinger, ont obtenu de bons résultats.

D'autres, comme Hermann Müller et Herzeld, plus récemment, n'ont pu par ce procédé déceler l'urobiline sanguine dans tous les cas d'urobilinurie. Ce résultat n'étonne pas, si l'on considère qu'une oxydation trop intense ne peut que nuire à la sensibilité d'une méthode.

Enfin, pour terminer ce rapide parallèle entre les deux procédés, nous ne devons pas omettre de signaler que dans la réaction de Grigaut, le coagulum d'albumine, en entraînant les pigments biliaires, est susceptible d'entraîner aussi une partie de l'urobiline. La sensibilité de la méthode peut en être diminuée d'autant.

Avec la technique de Schlesinger, cette éventualité n'est pas à redouter. La précipitation de l'albumine par l'alcool éthylique n'entraîne avec elle aucun pigment. Les pigments vrais, eux-mêmes, passent avec l'urobiline dans le filtrat.

C'est précisément ce passage de la bilirubine, qui gêne la réaction dans certains cas.

***

MM. Brulé et Weissmann ont été amenés à se servir de la méthode de Schlesinger pour leurs recherches d'urobiline dans le sang, à la suite des travaux de MM. Brulé et Garban sur les petites urobilinuries.

Ces travaux, publiés dans la *Presse Médicale* du 6 juillet 1921, avaient mis en évidence la supériorité de la méthode de Schlesinger, sur les méthodes employées jusque-là pour la caractérisation de l'urobiline urinaire.

MM. Brulé et Garban avaient constaté, en effet, que la spectroscopie et les procédés chimiques basés sur l'extraction préalable de l'urobiline, s'ils étaient suffisants pour déceler l'urobiline dans les cas où elle existe en assez grande quantité dans l'urine, ne donnaient pas de résultats constants pour la recherche des petites urobilinuries.

« En cherchant l'explication de ce fait, nous avons » pu nous assurer — écrivent-ils — que beaucoup des » méthodes de recherches considérées comme les plus » sensibles, entraînent en réalité des pertes importantes » d'urobiline ».

La technique de Grimbert basée sur la défécation de l'urine par le réactif de Denigès au sulfate mercurique, pas plus que les procédés d'extraction de l'urobiline par les solvants, n'échappe à cet inconvénient :

En effet le procédé de Grimbert comparable à celui que Grigaut préconise pour le sang, est passible des reproches adressés à ce dernier : oxydation trop forte, d'où destruction possible de l'urobiline ; perte de l'urobiline, qui se précipite en même temps que les pigments ; extraction incomplète par le chloroforme.

Ainsi, à tous ces procédés, susceptibles de laisser échapper ou de détruire une partie de l'urobiline, MM. Brulé et Garban ont substitué l'emploi du procédé de Schlesinger.

Ce procédé, très sensible, leur a permis de déceler constamment la présence de petites quantités d'urobiline dans les urines des adultes normaux, et de résoudre ainsi le problème controversé jusqu'alors, de l'urobilinurie physiologique.

*
* *

Les recherches d'urobiline dans le sang que nous avons pu effectuer avec la méthode de Schlesinger, nous ont convaincue de la simplicité et de la sensibilité de cette méthode.

Elle nous a permis de déceler l'urobiline dans des quantités très faibles de sérum, et avec la plus grande netteté, puisque la fluorescence apparaît en général à la lumière du jour.

L'examen n'a été négatif que dans les cas de bilirubinémie intense, où une trop forte coloration du sérum par les pigments biliaires empêche l'appréciation de la fluorescence.

C'est donc avec raison, que M. Brulé a préconisé l'ap-

plication de ce procédé, qui a grandement amélioré nos moyens d'investigations, en ce qui concerne la recherche de l'urobiline dans le sang.

En 1922, il a d'ailleurs fait ressortir la supériorité de cette méthode, et publié, avec Weissmann, les excellents résultats qu'il en avait obtenus.

*
* *

Nous avons examiné dans le service de M. le prof. Widal, le sang de 31 malades urobilinuriques, atteints d'affections lésant primitivement ou secondairement le foie.

Dans 28 de ces cas, nous avons rapidement et nettement décelé l'urobiline dans le sang.

Dans les 3 autres, nous n'avons pu apprécier la fluorescence, masquée qu'elle était par une forte proportion de bilirubine. Il s'agissait, en effet, de malades atteints de cirrhose avec ictère très foncé, et dont la cholémie était respectivement de 1/3000, 1/4000, 1/5000.

Pour doser la bilirubine dans le sérum, nous avons employé la méthode de Fouchet :

On fait tomber dans un godet de porcelaine, une quinzaine de gouttes du sérum à examiner. On ajoute autant du réactif suivant :

Acide trichloracétique	5 gr.
Eau distillée	20 cc.
Perchorure de fer officinal.	2 cc.

Les albumines, en se précipitant, entraînent les pigments biliaires, qui colorent le précipité en bleu ver-

dâtre, plus ou moins foncé suivant le degré de la cholémie. On mesure celle-ci en comparant la teinte obtenue avec celles d'une échelle colorimétrique, qui apprécie les cholémies entre 1/40.000 et 1/2.000.

Le dosage de la bilirubine dans les sérums qui nous ont donné des réactions positives, a révélé des chiffres allant de 1/40.000 à 1/10.000.

Nous avons ainsi constaté qu'une cholémie de 1/10.000 n'est pas suffisante pour masquer la fluorescence dans un sérum traité par la méthode de Schlesinger.

Par contre, avec 1/5000, la fluorescence n'apparaît pas.

A l'appui de ce que nous avançons, nous donnons ci-après le détail des examens que nous avons pu pratiquer.

Dieulafoy 21 — Cirrhose éthylique

Urine	Urobiline +
	Bilirubine —
Sang	Urobiline +
	Bilirubine 1/30.000

Lancereaux 15 — Cirrhose avec ascite

Urine	Urobiline +
	Bilirubine —
Sang	Urobiline +
	Bilirubine 1/20.000

Lancereaux 31 — Ulcus gastrique probable
Subictère

Urine	Urobiline +
	Bilirubine +
Sang	Urobiline +
	Bilirubine 1/10.000

Dreyfus-Brissac 5 — Cirrhose avec ictère

Urine	Urobiline +
	Bilirubine +
Sang	Urobiline +
	Bilirubine : entre 1/15.000 et 1/10.000

Brouardel 6 bis — Cirrhose avec ascite

Urine	Urobiline +++
	Bilirubine —
Sang	Urobiline ++
	Bilirubine 1/30.000

Josias 3 — Cirrhose

Urine	Urobiline ++
	Bilirubine —
Sang	Urobiline +
	Bilirubine 1/40.000

Brouardel 4 — Cirrhose avec ascite

Urine	Urobiline +
	Bilirubine +
Sang	Urobiline +
	Bilirubine : entre 1/15.000 et 1/10.000

Lancereaux 4 — Foie cardiaque

Urine	Urobiline +++
	Bilirubine —
Sang	Urobiline ++
	Bilirubine 1/40.000

Delpeuch 4 — Cirrhose avec ictère

Urine	Urobiline ++
	Bilirubine +
Sang	Urobiline +
	Bilirubine 1/10.000

Lancereaux 32 — Cirrhose hypertrophique

Urine	Urobiline ++
	Bilirubine —
Sang	Urobiline +
	Bilirubine 1/40.000

Brouardel 15 — Fièvre typhoïde

Urine	Urobiline +++
	Bilirubine —
Sang	Urobiline ++
	Bilirubine 1/40.000

Dieulafoy 16 — Cirrhose — Ictère grave

Urine	Urobiline +
	Bilirubine +++
Sang	Urobiline — Schlesinger et Grigaut
	Bilirubine 1/3.000

Dreyfus-Brissac — Ictère

Urine : Urobiline +
Bilirubine +

Sang : Urobiline +
Bilirubine 1/10.000

Brouardel 9 — Cirrhose

Urine : Urobiline +++
Bilirubine —

Sang : Urobiline ++
Bilirubine 1/40.000

Dreyfus-Brissac 15 bis — Cancer de l'estomac
Propagation au foie ?

Urine : Urobiline ++
Bilirubine —

Sang : Urobiline +
Bilirubine 1/40.000

Dreyfus-Brissac 21 — Cirrhose avec ictère

Urine : Urobiline +
Bilirubine +

Sang : Urobiline +
Bilirubine : entre 1/15.000 et 1/10.000

Brouardel 1 bis — Cirrhose

Urine : Urobiline +++
Bilirubine —

Sang : Urobiline ++
Bilirubine 1/40.000

Delpeuch 5 — Cirrhose hypertrophique éthylique

Urine	Urobiline +++
	Bilirubine —
Sang	Urobiline ++
	Bilirubine 1/30.000

Viel 13 — Cancer du foie

Urine	Urobiline +
	Bilirubine —
Sang	Urobiline +
	Bilirubine 1/30.000

Dieulafoy 4 — Cirrhose avec ascite

Urine	Urobiline +
	Bilirubine +
Sang	Urobiline +
	Bilirubine 1/10.000

Siredey 4 — Cirrhose avec ascite

Urine	Urobiline +++
	Bilirubine —
Sang	Urobiline ++
	Bilirubine : entre 1/30.000 et 1/25.000

Dieulafoy 23 — Cirrhose — Subictère

Urine	Urobiline +
	Bilirubine —
Sang	Urobiline +
	Bilirubine 1/30.000

Delpeuch 1 — CIRRHOSE AVEC ICTÈRE FONCÉ

Urine : Urobiline +
Bilirubine ++

Sang : Urobiline — Schlesinger et Grigaut
Bilirubine 1/4.000

Viel 13 — CIRRHOSE

Urine : Urobiline ++++
Bilirubine —

Sang : Urobiline +++
Bilirubine 1/40.000

Lancereaux 20 — CIRRHOSE

Urine : Urobiline ++
Bilirubine +

Sang : Urobiline ++ Schlesinger
+ Grigaut
Bilirubine : entre 1/15.000 et 1/10.000

Delpeuch 22 — PNEUMONIE — ICTÈRE

Urine : Urobiline ++
Bilirubine +

Sang : Urobiline ++ Schlesinger
+ Grigaut
Bilirubine 1/10.000

Delpeuch 6 — CIRRHOSE

Urine : Urobiline +++
Bilirubine —

Sang . . . . . { Urobiline ++ Schlesinger
+ Grigaut
Bilirubine 1/30.000

Delpeuch 3 — Cirrhose

Urine . . . . . { Urobiline +
Bilirubine —

Sang . . . . . { Urobiline +
Bilirubine 1/30.000

Dieulafoy 2 — Cirrhose avec ictère

Urine . . . . . { Urobiline ++
Bilirubine +

Sang . . . . . { Urobiline ++ Schlesinger
+ Grigaut
Bilirubine : entre 1/15.000 et 1/10.000

Viel 18 — Hépatite

Urine . . . . . { Urobiline ++++
Bilirubine —

Sang . . . . . { Urobiline ++
Bilirubine

Lancereaux 2 — Ictère

Urine . . . . . { Urobiline +
Bilirubine +++

Sang . . . . . { Urobiline — Schlesinger et Grigaut
Bilirubine 1/5.000

CONCLUSIONS

1° Le procédé de Schlesinger nous a permis de déceler constamment l'urobiline dans le sang de tous les malades urobilinuriques que nous avons examinés, exception faite pour ceux qui présentaient une cholémie très intense.

Les anciens procédés : procédé spectroscopique, procédés chimiques basés sur l'extraction de l'urobiline par les dissolvants, avaient donné aux auteurs qui les ont employés des résultats inconstants.

2° Avec la même quantité d'un même sérum, le procédé de Schlesinger nous a fait obtenir des réactions de fluorescence plus nettes que par le procédé de Grigaut.

Dans les cas de forte bilirubinémie où il s'est montré négatif, le procédé de Grigaut l'a été également.

Si nous ajoutons que le procédé de Schlesinger est plus simple et plus rapide que tous les autres — que le procédé de Grigaut en particulier — nous nous croyons autorisée à conclure à sa supériorité.

C'est, à notre avis, le moyen d'investigation le plus sensible que nous ayons actuellement à notre disposition pour la recherche de l'urobiline dans le sang.

Vu, *le Doyen*,
H. ROGER.

Vu, *le Président*,
SICARD.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
APPELL.

BIBLIOGRAPHIE

LEUBE. — *Verh. Wurzburg, phys. med. ges.*, 1888.

HARLEY. — *British Med. Journal*, 1896.

BOIX. — *Manuel de Médecine*, Debove-Achard.

GIARRE. — *Lo Sperimentale.*

GILBERT et HERSCHER. — *La Presse Médicale*, 3 septembre 1902, n° 71.

HERSCHER. — *Thèse de Paris*, 1902.

HAYEM. — *Leçons sur les maladies du sang* (Paris, 1900).

CLARENS. — *Thèse de Toulouse*, 1903.

Louis LEMAIRE. — L'urobiline (*Thèse de Paris*), 1905.

GRIGAUT. — *C. R. de la Société de Biologie*, 8 mai 1909.

MOREL et POLICARD. — *Société médicale des Hôpitaux de Lyon*, 24 janvier 1911.

BRULÉ et WEISSMANN. — *C. R. de la Société de Biologie*, 17 juin 1922.

BRULÉ et GARBAN. — *La Presse Médicale*, 6 juillet 1921, n° 54.

BRULÉ. — *Recherches sur les ictères*, 1922.

OBERMAYER et POPPER. — *Wiener med. Woch.*, 1910.

EPPINGER et RANZI. — *Die hepatolienalen Erkrankungen*, 1920.

HERMANN-MÜLLER. — *Schweiz. Mediz. Woch.*, 1922, n° 5.

E. HERZFELD. — *Schweiz. Mediz. Woch.*, 1922, n° 21.

SCHLÉSINGER. — *Deutsche Med. Wochenchsch.*, 6 avril 1903.

TABLE DES MATIÈRES

Importance de la recherche de l'urobiline dans le sang..... 11
Procédés de recherche de l'urobiline dans le sang..... 17
Procédés chimiques..... 20
I. — Extraction de l'urobiline par le seul emploi de dissolvant..... 21
II. — Extraction de l'urobiline par un dissolvant, après élimination des pigments..... 24
Conclusions..... 39
Bibliographie..... 41

Saint-Amand (Cher). — Imprimerie A. CLERC.